

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.015

应用 SELEX 技术筛选人类血型 IgG 适体的实验研究 *

龙宇鹏 谭琳琳 刘 利 石小平 任 君[△]

(中国人民解放军第 324 医院检验科 重庆 400020)

摘要 目的:建立 Rh(D)血型的 IgG 类抗体适体的筛选方法,为后续合成适体并进行新生儿溶血病的防治研究奠定基础。**方法:**利用 SELEX 技术,构建含有 52 个随机序列的单链 DNA 文库,利用硝酸纤维素膜法筛选与 IgG 类抗体分子高亲和力结合的核酸分子,同时探索并优化将其扩增为双链 DNA 核酸库的 PCR 反应条件;通过膜结合实验检测核酸分子的富集效果并用凝胶阻滞实验初步测定所得核酸适体与 Rh(D)血型 IgG 类抗体的亲和力。**结果:**随着筛选的进行,核酸分子的富集库向着与靶分子亲和性增强的方向进化,经过了 11 个循环,筛选出与 Rh(D)血型 IgG 抗体结合力较强的核酸分子,与核酸结合的 IgG 分子在凝胶阻滞实验中显示出阻滞带。**结论:**初步建立了利用 SELEX 技术筛选人类 Rh(D)血型 IgG 抗体适体的方法。

关键词: Rh(D)血型; IgG 抗体; 适体; 配体系统进化的指数富集技术

中图分类号: R722.18 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)29-5658-04

Research on Applying SELEX Technology Screening Human Blood IgG Aptamer*

LONG Yu-peng, TAN Lin-lin, LIU Li, SHI Xiao-ping, REN Jun[△]

(Department of Clinical laboratory, The 324th Hospital of PLA, Chongqing, 400020, China)

ABSTRACT Objective: To establish the screening methods of human Rh (D) blood IgG aptamers to make foundation for the subsequent synthesis of aptamers and prevention of hemolytic disease of the newborn. **Methods:** By using the SELEX technology, single-stranded DNA library was constructed containing 52 random sequences. The nucleic acid molecules of high affinity with IgG class antibody were screened by using the nitrocellulose membrane. Meanwhile, the experimental conditions of amplifying the nucleic acid into double-stranded DNA library were explored and optimized, and the enrichment of nucleic acid molecules was examined by membrane binding assay. The affinity between Rh (D) blood type IgG class antibodies with its aptamer was preliminarily determined by gel shift assay. **Results:** With the ongoing of screening, nucleic acid molecules enriched library got evolution toward the direction of enhanced affinity with the target molecule. After 11 loops, the nucleic acid molecule of strong affinity with Rh (D) blood IgG antibody was found out, and it shown blocked belt after binding with IgG molecules in gel shift assay. **Conclusion:** The screening method on aptamer of human Rh (D) blood IgG antibody based on SELEX technology was established initially.

Key words: Rh(D) blood type; IgG antibody; aptamer; Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

Chinese Library Classification(CLC): R722.18 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5658-04

母体的免疫系统可以针对其循环血中内源性和外源性的 ABO 和 Rh 血型抗原产生相应的多种抗体,其中 IgG 类抗体的分子大小在 150kDa-160kDa 左右,是唯一能够通过胎盘屏障并进入胎儿血液循环中的抗体^[1]。如果母体与胎儿的血型不合,那么这些 IgG 抗体可以与胎儿的红细胞表面的相应抗原相结合,迅速地激活补体系统,进而导致血管内的溶血,严重地危及胎儿生命,是造成新生儿溶血病(hemolytic disease of newborn, HDN)发生的主要原因。Rh 血型不合所致的 HDN 虽仅占 14.6%,但其起病较 ABO 血型不合所致 HDN 更加紧急,且发病后常因血源紧张而使新生儿无法得到及时救治,死亡率较高^[2]。因此,如果能找到与人类血型,特别是可以与 Rh(D)血型的

IgG 类抗体形成高亲和力结合的适体(aptamer),并运用该适体的封闭效应阻断 IgG 类抗体与胎儿红细胞表面抗原的结合,可能会为有效地预防或治疗因 Rh 血型不合所致的 HDN 提供新的策略。本研究以 Rh(D)血型的 IgG 抗体为靶标,应用配体系统进化的指数富集(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)技术筛选并获得了该抗体的适体^[3],为进一步纯化和使用该适体防治 Rh 血型不合所致的 HDN 提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料和主要试剂

* 基金项目:重庆市卫生局医学科科研项目(2011-2-590)

作者简介:龙宇鹏,女,硕士,主管技师,主要研究方向:临床检验新技术与输血治疗, E-mail: lyp_emily@126.com

△ 通讯作者:任君,男,副主任技师,主要研究方向:临床检验新技术与输血治疗, E-mail: rj73@sohu.com

(收稿日期:2014-03-11 接受日期:2014-04-10)

人类 Rh(D)血型 IgG 免疫性抗体(公司,美国),随机序列 DNA 库 (5'-ATACCAGCTTAT TCA ATT- 52-NT -AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'); (上海生工公司,中国),两端为固定序列,中间为 52bp 的随机序列。

上游引物 1: 5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT -3

下游引物 2: 5'-AGA TTG CAC TTA CTA TCT -3。(上海生工公司,中国)

cDNA 合成试剂盒(Amersham 公司,美国);快速 PCR 纯化试剂盒(Qiagen 公司,德国);体外转录试剂盒(Ambion,美国);T4 多聚核苷酸激酶试剂盒(Promega,美国); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (上海锐博生物公司,中国);硝酸纤维素膜(孔径为 0.45 μm , Millipore 公司,美国)。

1.2 主要仪器

实时荧光定量 PCR 仪(Rotor-Gene 公司,美国);MVT-28 凝胶成像仪(HEROLAB 公司,德国);垂直电泳槽(Amersham 公司,美国)等。

1.3 建立初始的 RNA 随机库

取 20 μg 随机 ssDNA 库中的 ssDNA 作为核酸源,平行进行 60 管 PCR 反应,每管的总反应体积为 100 μL ,退火温度定为 55 $^{\circ}\text{C}$,循环数定为 5 次。在混悬器上混匀每管的反应产物,将其溶于异丙醇中进行沉淀处理,再按照快速 PCR 纯化试剂盒的操作程序纯化上述 PCR 的反应产物,得到 dsDNA,然后全部进行体外转录,具体的程序按照体外转录试剂盒的说明书操作。将所得到的转录产物加入至含有 8%聚丙烯酰胺和 8 mol/L 尿素的溶液中进行变性,而后进行琼脂糖凝胶电泳,在紫外线显像仪下可观察到含有全长 RNA 的凝胶片段已分离,将其切下并碾碎后加入至 RNA 回收液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡台上过夜,使用滤膜过滤回收液除去凝胶,再次用异丙醇沉淀核酸分子,并将析出的 RNA 置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中过夜。在低温离心机中 12000 $\times$ g 离心 30 min 来回收 RNA。使用无酶 ddH₂O 溶解回收后的 RNA,并在 260 nm 波长的光下检测所得的 RNA 的吸光度值。

1.4 SELEX 筛选

①配置 0.1 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液作为缓冲液,将 pH 调节至 8.6 制成抗体的包被液,将 Rh(D)血型 IgG 抗体分子包被于 96 孔酶联板上作为实验组,而未加入 IgG 抗体分子仅含包被液的作为空白对照组,均置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。②取出酶联板在室温下复温,两组孔板均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中用 1%的 BSA 封闭 2 h。③调节 SHCMK 液(20 mmol/L Hepes)的 pH 至 7.35,并加入等量的 120 mmol/L NaCl、1mmol/L CaCl₂、5 mmol/L KCl 和 1 mmol/L MgCl₂ 配制结合缓冲液进行反筛,以除去可与 IgG 抗体非特异性结合的 ssDNA;④将 ssDNA 随机核酸库与一定量的 tRNA 加至结合缓冲液中混匀,首先加至空白对照组的孔板上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中作用 40min,去除可以与 BSA 相结合的 ssDNA;将初次结合后的缓冲液转移至实验组孔板中,与 Rh(D)血型 IgG 抗体分子在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下结合 40 min;⑤将 SHCMK 液加入至等量的 0.05%的 Tween20 溶液中配制成冲洗缓冲液,反复冲洗结合后的孔板 6 次,充分去除未与抗体分子结合的 ssDNA;⑥使用等量的 20 mmol/L 的 Tris-HCl、4 mol/L 的异硫氰酸胍和 1mmol/L 的 DTT 配制成洗脱缓冲液并

将 pH 调整至 8.3,将洗脱缓冲液加至冲洗后的孔板中,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中作用 10min,以洗脱下与 IgG 抗体分子相结合的 ssDNA;⑦使用酚-氯仿抽提 ssDNA,去除蛋白质,再用乙醇将 ssDNA 析出,取下层沉淀;将 ssDNA 溶解在 20 μL TE 缓冲液中;⑧利用 PCR 进行扩增,反应体系包括:模板 5 μL , 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μL , dNTPs 100 μmol , Taq 酶 2U, 上下游引物各 50pmol, MgCl₂ 6 μL , 加入去离子水至 100 μL ; PCR 反应所用条件为:先在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 3 min,再按照 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s-55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min -72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共进行 20 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;⑨PCR 产物再次用酚-氯仿抽提和乙醇沉淀,然后将提取的 ssDNA 溶解于结合缓冲液中;⑩重复以上步骤连续筛选 10 个循环,每个循环的操作方法相同,但只做 1 孔反应。最终可以获得与 Rh(D)血型 IgG 抗体分子特异结合的核酸适体。

1.5 膜结合实验

①用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 和 T4 多聚核苷酸激酶对获得的核酸分子进行放射性标记,随后将已有放射性的转录产物加至变性液(含有 8%聚丙烯酰胺和 8 mol/L 尿素的溶液)中变性,再进行琼脂糖凝胶电泳,富集和纯化具有放射性同位素标记的 RNA,再加热使之变性;②用 100 μL 结合缓冲液将 IgG 抗体分子和上述核酸分子混匀,调整抗体和核酸终浓度分别达 5 nmol/L 和 10 nmol/L,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 1 h 后用真空泵过滤;③用 30 mL PBS 冲洗滤膜,待滤膜自然干燥后,再使用液体闪烁计数器测定滤膜上残留物的放射量,同一个样品重复测三次。对照组为含有放射性标记但未与 IgG 抗体孵育的核酸分子。

1.6 凝胶阻滞测定

①取 50fmol 有放射标记且已经过热变性的 RNA 与 1 pmol/L 的 IgG 抗体,将其加至 10 μL 的结合缓冲液中混匀,在室温下静置 30 min 以充分作用;②将该混合液加入至 4%的聚丙烯酰胺凝胶中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、350 V 条件下进行电泳 50 min;③取出凝胶,进行放射自显影。

1.7 统计学分析

运用 SPSS18.0 统计软件对实验结果进行统计学分析,各组的测量结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 筛选过程 PCR 反应的条件优化

每轮筛选后均需要根据所获得产物的量和结合特异性调整下一轮扩增和筛选所需的条件,实现反应条件的不断优化,主要包括 DNA 模板用量、IgG 的用量、孵育时间和所用洗脱缓冲液体积等参数(见表 1)。

2.2 每轮筛选产物膜结合实验的测定结果

本研究以核酸-蛋白复合物的残留放射量占反应总体 DNA 放射量的百分比为参照,比较每轮筛选产物对 IgG 抗体的亲和性。随着筛选次数的增加,筛选产物的放射量百分比呈逐渐上升的趋势(见图 1,图 2)。实验初始的 ssDNA 在硝酸纤维素膜上的放射残留百分比小于 1%;经过 4 轮的筛选和富集,膜上的放射残留比例已有明显升高,达到 17.78%,经检验,较初始 ssDNA 有显著的差异($P<0.01$);当筛选至第 9 轮以后,硝酸纤维素膜上的残留物放射量已超过 50%,经检验,与初始 ssDNA 及第 4 轮的筛选产物相比均具有显著差异($P<0.01$);且

从第 9 轮以后,随筛选轮数的增加,残留物放射量百分比不再 继续有显著的增加($P > 0.05$)。

表 1 每轮筛选的具体条件

Table 1 Specific conditions of selection in each round

轮次 Loop	DNA(pmol/L)	IgG(pmol/L)	孵育时间(min) Incubation time	洗脱液体积(ml) Elution liquid volume
1	2000	1000	2400	15
2	200	100	120	30
3	200	100	120	30
4	200	50	60	30
5	200	50	60	30
6	200	50	60	45
7	200	50	60	45
8	200	20	30	45
9	200	20	30	60
10	200	20	30	60
11	200	20	30	60

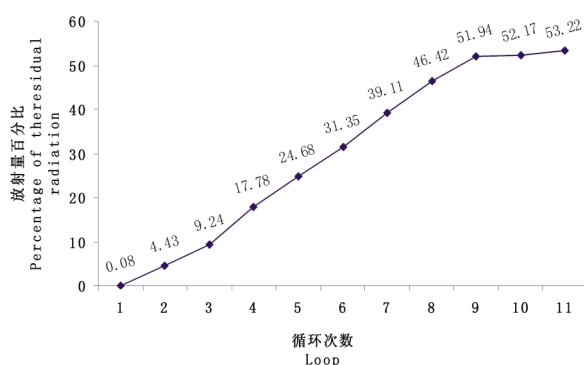


图 1 每轮循环筛选产物在硝酸纤维素膜上的残留放射量的百分比

Fig. 1 The percentage of the residual radiation of filtered products on nitrocellulose membrane after each loop

2.3 第 9 轮筛选后特异性核酸富集效果检测

经过 9 轮的筛选,将筛选产物进行 PCR 扩增,再用变性 PAGE 进行分析,结果显示:阳性管在第 14 个循环后即可扩增出较稳定的目标条带,而阴性管在第 16 个循环后才出现条带且较少,直至第 18 个循环后才有较稳定的目标条带出现,因此,阳性管在第 9 轮筛选后出现大量特异性的核酸序列富集,筛选的条件和效果均较为理想。

2.4 凝胶阻滞实验的测定结果

凝胶阻滞实验显示:上述筛出的特异性核酸序列可以与 Rh(D)血型 IgG 抗体结合,使其电泳的条带呈现阻滞现象(见图 3),提示筛选出的核酸序列与靶蛋白 Rh(D)抗体 IgG 的亲及特异性较为理想。

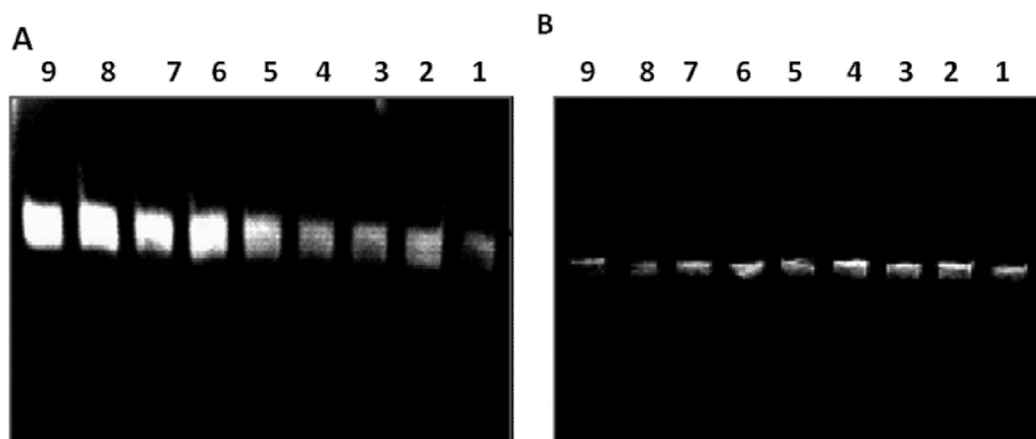


图 2 第 9 轮筛选后鉴定核酸的富集效果

Fig. 2 Identification of nucleic acid accumulation effect after 9 loops

A 阳性管 B 阴性管 (1,2,3,4,5,6,7,8,9,分别代表第 2,4,6,8,10,12,14,16,18 个循环)

A Positive tube B Negative tube (1,2,3,4,5,6,7,8,9

stand for loop number 2,4,6,8,10,12,14,16,18 respectively)

3 讨论

SELEX 技术自上个世纪 90 年代开始逐渐兴起,已经发展成为一项独立的分子化学技术^[4]。其基本工作原理是:首先利用化学合成单链 DNA,建立一个容量巨大的随机序列寡核苷酸

文库;将文库中的核酸分子与靶分子置于结合缓冲液中孵育,部分具有特异性结构的核酸分子可与靶分子之间形成共价结合而使两者相连,再用机械冲洗的方法将未与靶分子结合的核酸去除,然后用物理萃取的方法把已结合到靶分子上的核酸分子分离出来,运用 PCR 扩增法克隆具有结合能力的核酸



A IgG 蛋白; B 筛选后的核酸序列 + IgG 蛋白

图3 凝胶阻滞实验结果

A IgG protein; B The nucleic acid sequence after screening + IgG protein

Fig. 3 The results of gel block experiments

分子,获得大量与靶分子有一定亲和力的核酸库^[9];重复上述筛选的循环,通常经过8到15轮的筛选与扩增,核酸分子与靶分子的亲和效应可达到饱和,进一步分离可以获得大量与靶分子紧密结合的核酸分子,对其进行测序即可得到每条核酸的序列,甚至可以利用分子拓扑学软件对该核酸分子的二级结构进行分析,结合其亲和力的大小可确定为靶分子的适体。在临床需要的基础上,可以根据疾病的诊疗需要人工合成一定量的特定适体,达到临床诊疗目的^[6,7]。多种蛋白质(包括酶、抗体等)、多肽、细胞黏附分子、生长因子、基因调控分子、完整的病毒颗粒甚至整个细胞均可以筛选出与之相应的核酸适体^[8-11]。由于核酸适体与蛋白特异性结合后往往能抑制蛋白的功能,而且由于核酸分子较小,缺乏免疫原性,而体内渗透力强,所以是一种十分有应用潜力的治疗性药物,可用于直接干扰疾病的发生发展过程^[12,13]。

在 SELEX 筛选核酸适体过程中,初始核酸文库的完整性和随机性至关重要。本研究使用了 20 μg 的初始 ssDNA,约含有 3.5×10^{14} 的核酸分子,保证了文库的完整和多样性^[14];而建立初始核酸文库仅进行 5 个循环的 PCR 扩增就是为了尽量确保文库的随机性和均等性,防止产生大量序列偏差的核酸^[15]。随着循环数的增加,逐步降低核酸与蛋白比例、减少孵育时间、增加洗膜缓冲液用量,都是为了增大筛选难度,有利于选出亲和力强、结合特异的分子^[16]。由于核酸与靶蛋白结合后形成的复合物较大,可在硝酸纤维膜滤过时被截留在膜上,而未与蛋白结合的核酸则可自由通过纤维膜^[17]。利用这一原理,我们在膜结合测定实验中,通过膜上残留的放射性高低对所获得的核酸进行亲和力鉴定,结果提示这些核酸分子可以向与靶蛋白 IgG 抗体的亲和力增强的方向逐轮进化,符合预期的研究目标。为了进一步验证分子与 IgG 抗体的结合能力,本研究采用了凝胶阻滞实验,结果发现 IgG 抗体分子因与核酸结合而在电泳中呈现阻滞状态。既往研究表明,只有当解离常数低于 10^{-8} 时才会出现这一现象^[18],据此初步证实了 Rh(D)血型 IgG 抗体与所得核酸结合的紧密程度。

总之,SELEX 技术筛选核酸分子作为适体的作用范围非常广泛^[19,20]。本研究正是选定可引起 HND 的 Rh(D)的 IgG 类血型抗体,通过 SELEX 技术的多轮筛选,建立了获得目的核苷酸片段的方法,为下一步大量合成血型 IgG 抗体的适体、临床防治 HDN 提供理论依据及实验基础。

参考文献(References)

- [1] Rath ME, Smits-Wintjens VE, Walther FJ, et al. Hematological morbidity and management in neonates with hemolytic disease due to red cell alloimmunization[J]. Early Hum Dev, 2011, 87(9): 583-588
- [2] Basu S, Kaur R, Kaur G, et al. Severe hemolytic disease of newborn due to non Rh D antibody[J]. Indian J Pediatr, 2011, 78(3): 366-367
- [3] Keefe AD, Cload ST. SELEX with modified nucleotides[J]. Curr Opin Chem Biol, 2008, 12(4): 448-456
- [4] Zhang Y, Chen Y, Han D, et al. Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies[J]. Bioanalysis, 2010, 2(5): 907-918
- [5] Zimmermann B, Bilusic I, Lorenz C, et al. Genomic SELEX: a discovery tool for genomic aptamers[J]. Methods, 2010, 52(2): 125-132
- [6] Shamah SM, Healy JM, Cload ST. Complex target SELEX [J]. Acc Chem Res, 2008, 41(1): 130-138
- [7] Dassie JP, Giangrande PH. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics[J]. Ther Deliv, 2013, 4(12): 1527-1546
- [8] Citartan M, Gopinath SC, Tominaga J, et al. Assays for aptamer-based platforms[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 34(1): 1-11
- [9] Musumeci D, Montesarchio D. Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: a focus on the thrombin binding aptamer [J]. Pharmacol Ther, 2012, 136(2): 202-215
- [10] Zhou J, Rossi JJ. Therapeutic potential of aptamer-siRNA conjugates for treatment of HIV-1[J]. BioDrugs 2012,26(6):393-400
- [11] Meyer C, Hahn U, Rentmeister A. Cell-specific aptamers as emerging therapeutics[J]. J Nucleic Acids, 2011, 2011: 904750
- [12] Ray P, Viles KD, Soule EE, et al. Application of aptamers for targeted therapeutics[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013, 61 (4): 255-271
- [13] Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(7): 537-550
- [14] Wen AQ, Yang QW, Li JC, et al. A novel lipopolysaccharide-antagonizing aptamer protects mice against endotoxemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382(1): 140-144
- [15] Gold L, Janjic N, Jarvis T, et al. Aptamers and the RNA world, past and present[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(3)
- [16] Marimuthu C, Tang TH, Tominaga J, et al. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation [J]. Analyst, 2012, 137(6): 1307-1315
- [17] Davydova AS, Vorobjeva MA, Venyaminova AG. Escort aptamers: new tools for the targeted delivery of therapeutics into cells [J]. Acta Naturae, 2011, 3(4): 12-29
- [18] Ma J, Wang MG, Mao AH, et al. Target replacement strategy for selection of DNA aptamers against the Fc region of mouse IgG [J]. Genet Mol Res, 2013, 12(2): 1399-1410
- [19] Sundaram P, Kurniawan H, Byrne ME, et al. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials[J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 48(1-2):259-271
- [20] Zhang J, Liu B, Liu H, et al. Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis[J]. Nanomedicine (Lond), 2013, 8(6): 983-993